



CLÍNICA E INVESTIGACIÓN EN  
**ARTERIOSCLEROSIS**

[www.elsevier.es/arterio](http://www.elsevier.es/arterio)



REVISIÓN

## Epigenética en la arteriosclerosis

Montse Guardiola<sup>a</sup>, Joan C. Vallvé<sup>a</sup>, Silvio Zaina<sup>b</sup> y Josep Ribalta<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Unitat de Recerca de Lípids i Arteriosclerosi, Facultat de Medicina, Universitat Rovira i Virgili, Reus, España*

<sup>b</sup> *Departamento de Ciencias Médicas, División de Ciencias de la Salud, Universidad de Guanajuato, Campus León, León, Guanajuato, México*

Recibido el 23 de febrero de 2015; aceptado el 15 de abril de 2015

### PALABRAS CLAVE

Epigenética;  
Arteriosclerosis;  
Metilación;  
ADN;  
Histonas;  
micro ARN

**Resumen** Los estudios de asociación basados en genes candidato llevados a cabo durante décadas han servido para visualizar la influencia del componente genético en enfermedades complejas como la arteriosclerosis y también para evidenciar la interacción entre diferentes genes y, especialmente, la de estos con factores ambientales. Incluso con el conocimiento acumulado, aún queda camino por recorrer para descifrar la predisposición individual a la enfermedad y, si tenemos en cuenta la gran influencia que los factores ambientales juegan en el desarrollo y la progresión de la arteriosclerosis, la epigenética se nos presenta como un elemento clave para ampliar nuestro conocimiento de la predisposición individual a la arteriosclerosis.

La epigenética se puede describir como la disciplina que estudia los mecanismos de regulación transcripcional independientes de la secuencia del ADN, mayoritariamente inducidos por factores ambientales.

Esta revisión pretende describir qué es la epigenética y de qué manera los mecanismos epigenéticos participan en la arteriosclerosis.

© 2015 Sociedad Española de Arteriosclerosis. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

### KEYWORDS

Epigenetics;  
Atherosclerosis;  
Methylation;  
DNA;  
Histones;  
micro RNA

### Epigenetics in atherosclerosis

**Abstract** The association studies based on candidate genes carried on for decades have helped in visualizing the influence of the genetic component in complex diseases such as atherosclerosis, also showing the interaction between different genes and environmental factors. Even with all the knowledge accumulated, there is still some way to go to decipher the individual predisposition to disease, and if we consider the great influence that environmental factors play in the development and progression of atherosclerosis, epigenetics is presented as a key element in trying to expand our knowledge on individual predisposition to atherosclerosis and cardiovascular disease.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [josep.ribalta@urv.cat](mailto:josep.ribalta@urv.cat) (J. Ribalta).

Epigenetics can be described as the discipline that studies the mechanisms of transcriptional regulation, independent of changes in the sequence of DNA, and mostly induced by environmental factors.

This review aims to describe what epigenetics is and how epigenetic mechanisms are involved in atherosclerosis.

© 2015 Sociedad Española de Arteriosclerosis. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

## Justificación

Los estudios de asociación basados en genes candidato llevados a cabo durante décadas han servido para visualizar la influencia del componente genético en enfermedades complejas como la arteriosclerosis. Arrojan como balance la identificación de múltiples variaciones con un efecto individual generalmente muy modesto. Aun presentando la notable limitación de depender de nuestro incompleto conocimiento de los procesos fisiológicos y fisiopatológicos, han servido también para evidenciar la interacción entre diferentes genes y, especialmente, la de estos con factores ambientales. En la última década, el desarrollo de los *Genome-Wide Association Studies* (GWAS) se contemplaba como una posibilidad de avance muy significativa ya que permitiría llevar a cabo estudios de asociación a escala genómica sin depender de la elección de genes candidato. Si bien los GWAS han identificado un buen número de nuevos genes candidato, ha supuesto una relativa sorpresa el hecho de que la mayoría de los SNP no se encuentren en zonas codificantes y que la mayoría de los nuevos genes identificados no guarden una relación funcional evidente con la enfermedad cardiovascular<sup>1</sup>. Ello nos indica que, tanto desde un punto de vista genómico como fisiopatológico, nuestro conocimiento de la enfermedad cardiovascular es aún limitado. Por lo tanto, queda aún camino por recorrer para descifrar la predisposición individual a la enfermedad, la llamada «missing heritability» (causas de la transmisión de predisposición a la enfermedad cardiovascular, aún por identificar)<sup>2</sup>. Si además tenemos en cuenta la gran influencia que los factores ambientales juegan en el desarrollo y la progresión de la arteriosclerosis, la epigenética se nos presenta como un elemento clave para intentar ampliar nuestro conocimiento de la predisposición individual a la arteriosclerosis y la enfermedad cardiovascular. Esta revisión pretende describir qué es la epigenética y de qué manera los mecanismos epigenéticos participan en la arteriosclerosis.

## Definición

El ADN contiene codificada la información necesaria para la transcripción de nuestros genes. Los genes no están siempre expresados y no se expresan por igual en todos los tejidos. Por lo tanto, el ADN no siempre se transcribe a ARN, y el ARN no siempre se traduce a proteínas. La complejidad de

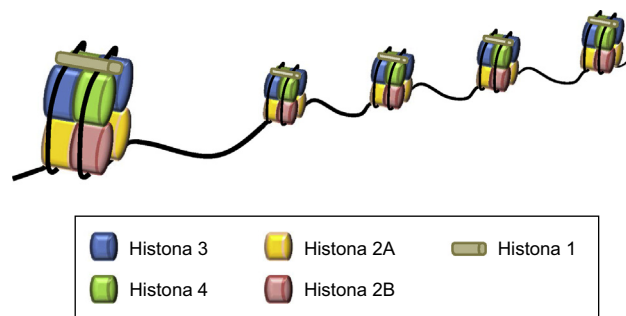


Figura 1 Estructura de la cromatina.

la regulación génica puede explicarse en parte gracias a la epigenética.

Existen varias definiciones de la epigenética pero la que probablemente mejor refleja su papel es que es la disciplina que estudia los procesos o modificaciones reversibles y heredables implicados en la regulación de la transcripción génica y que no dependen de cambios en la secuencia del ADN.

## Estructura de la cromatina

En el núcleo celular el ADN está empaquetado muy eficientemente y el grado de empaquetamiento determina la forma en que este ADN funcionará.

La cromatina es el primer nivel de empaquetamiento del ADN y representa el complejo formado por el ADN y las proteínas histonas organizadas formando un polímero cuya unidad básica son los nucleosomas, de manera que 146 pares de bases de ADN envuelven un octámero de histonas, formado por un tetrámero de las histonas H3 y H4 y 2 dímeros de H2A y H2B. La histona H1 mantiene los nucleosomas unidos sellando los giros completos del ADN (fig. 1).

A su vez, la cromatina está organizada estructuralmente formando la heterocromatina o la eucromatina. La heterocromatina es una cromatina muy compacta y corresponde a la mayor parte del material nuclear. La heterocromatina incluye los telómeros y regiones pericentroméricas que son regiones que tienden a ser ricas en secuencias repetitivas y que tienen un bajo contenido génico. En cambio, el resto del genoma está formado por la eucromatina que es una estructura más laxa y transcripcionalmente activa y que contiene la mayoría de los genes.

## Modificaciones epigenéticas

Las modificaciones epigenéticas que sufren el ADN y la cromatina suelen asociarse a diferentes estados de la cromatina que en último término deciden qué funciones están activas y cuáles inactivas en cada tejido específico.

### Metilación (e hidroximetilación) del ADN

La metilación del ADN es una de las modificaciones epigenéticas más estudiadas.

La metilación del ADN es un proceso activo y dinámico que tiene lugar gracias a una familia de enzimas, las ADN metiltransferasas (DNMT), que transfieren el grupo metilo desde la S-adenosil-metionina (SAM) al carbono 5' de las citosinas.

La metilación del ADN ocurre principalmente en las citosinas localizadas en los dinucleótidos CpG. Los dinucleótidos CpG suelen estar repartidos heterogéneamente por todo el genoma, pero las zonas del genoma en las que la frecuencia de estos dinucleótidos CpG es unas 10 veces mayor en comparación con la media del genoma se conocen como islas CpG<sup>3</sup>. Típicamente una isla CpG tiene al menos 200 pares de bases con más del 50% de contenido de guaninas y citosinas y una proporción de CpG observada respecto a la esperada mayor del 60%. Las islas CpG suelen localizarse cerca de los sitios de inicio de la transcripción y por eso suelen asociarse con la región promotora de los genes. Ello llevó a pensar que podían tener un papel clave en la regulación de la transcripción génica. La metilación de las islas CpG se ha asociado a represión de los genes debido a que la presencia de citosinas metiladas produce un cambio conformacional en la doble cadena del ADN que dificulta la unión de factores de transcripción e incluso la propia transcripción.

Los promotores de los genes están normalmente desmetilados y juegan un papel clave al controlar la regulación génica<sup>4</sup>.

El perfil de metilación del ADN y la regulación de la expresión génica son específicos del tejido y de la célula.

Recientes evidencias indican que la metilación de las citosinas también puede tener lugar en las regiones adyacentes a las islas CpG, la denominada «orilla» (a 2 kb flanqueando las islas CpG) e incluso que no está limitada a los dinucleótidos CpG, sino que también se ha descrito en los dinucleótidos CpA.

El patrón de metilación en un individuo se establece durante el desarrollo embrionario.

Mientras se forma el cigoto tiene lugar una desmetilación del ADN de las células germinales, y la metilación se reemprende durante las divisiones celulares necesarias del desarrollo (también se conoce como reprogramación epigenética). En este proceso participan las DNMT3A y DNMT3B que son metiltransferasas *de novo*, responsables de establecer el patrón de metilación de citosinas en el ADN no metilado<sup>5</sup>.

Una vez establecida la reprogramación, los patrones de metilación del ADN deberán ser mantenidos de forma estable por medio de las divisiones celulares. Esta función de mantenimiento se lleva a cabo gracias a la DNMT1, debido a su preferencia por el ADN hemimetilado y a su asociación estable con el ADN recién replicado, de tal manera que copia

los patrones de metilación de las cadenas parentales en las cadenas recién sintetizadas durante la replicación del ADN.

El grado de metilación de un ADN también viene establecido por la desmetilación. Este proceso no está tan bien estudiado. La desmetilación puede tener lugar de forma pasiva durante la replicación del ADN o de forma activa, eliminando grupos metilo durante la fertilización.

La hidroximetilación es un paso intermedio de la desmetilación activa del ADN. Es una oxidación de la metilación mediada gracias a la familia de enzimas ten-eleven-translocation y también ocurre en la posición 5' de las citosinas. Los niveles de hidroximetilación se han correlacionado con genes activos transcripcionalmente, al contrario de lo que mayoritariamente ocurre con la metilación<sup>6</sup>.

La hidroximetilación se ha descrito en todos los tejidos y tipos celulares estudiados hasta la fecha, aunque en mayor cantidad se ha descrito en el cerebro<sup>7</sup>. Mientras el porcentaje de citosinas metiladas a lo largo de diferentes tejidos está entre el 4 y 5% con relación a las guaninas, en el cerebro el 0,4-0,9% de las citosinas presentan hidroximetilación, y este porcentaje baja hasta el 0,2% en el riñón y 0,03% en el timo o los testículos<sup>8</sup>.

Respecto a la hidroximetilación se ha indicado que, además de marcador intermediario de la desmetilación, también puede servir como una nueva marca epigenética.

### Modificaciones de histonas

El grado de empaquetamiento de los nucleosomas en la cromatina puede afectar la actividad transcripcional del ADN. Varias modificaciones epigenéticas que afectan tanto al ADN (metilación) como a las proteínas histonas (modificaciones postraduccionales debidas a metilación, acetilación, fosforilación o ubiquitinización) participan en el estado de compactación de la cromatina.

Las histonas tienen un dominio carboxilo terminal globular y una cola amino terminal que es la que sufre las modificaciones. Las modificaciones de las histonas incluyen metilación en los residuos de lisina (abreviada como K) y arginina (R), acetilación en residuos de lisina, ubiquitinización y sumoilación de lisinas y fosforilación de serinas (S) y treoninas (T).

Las modificaciones postraduccionales de las histonas tienen efectos directos sobre la estructura de la cromatina y, por lo tanto, sobre la regulación de la expresión génica.

Por ejemplo, la acetilación de lisinas se relaciona normalmente con un estado activo transcripcionalmente, mientras que la metilación de la arginina o la lisina resulta en activación o represión dependiendo de la posición del residuo en la cadena de la histona. Estas modificaciones pueden generar interacciones sinérgicas o antagonistas con proteínas asociadas a la cromatina, modulando el acceso al ADN o reclutando activamente reguladores transcripcionales.

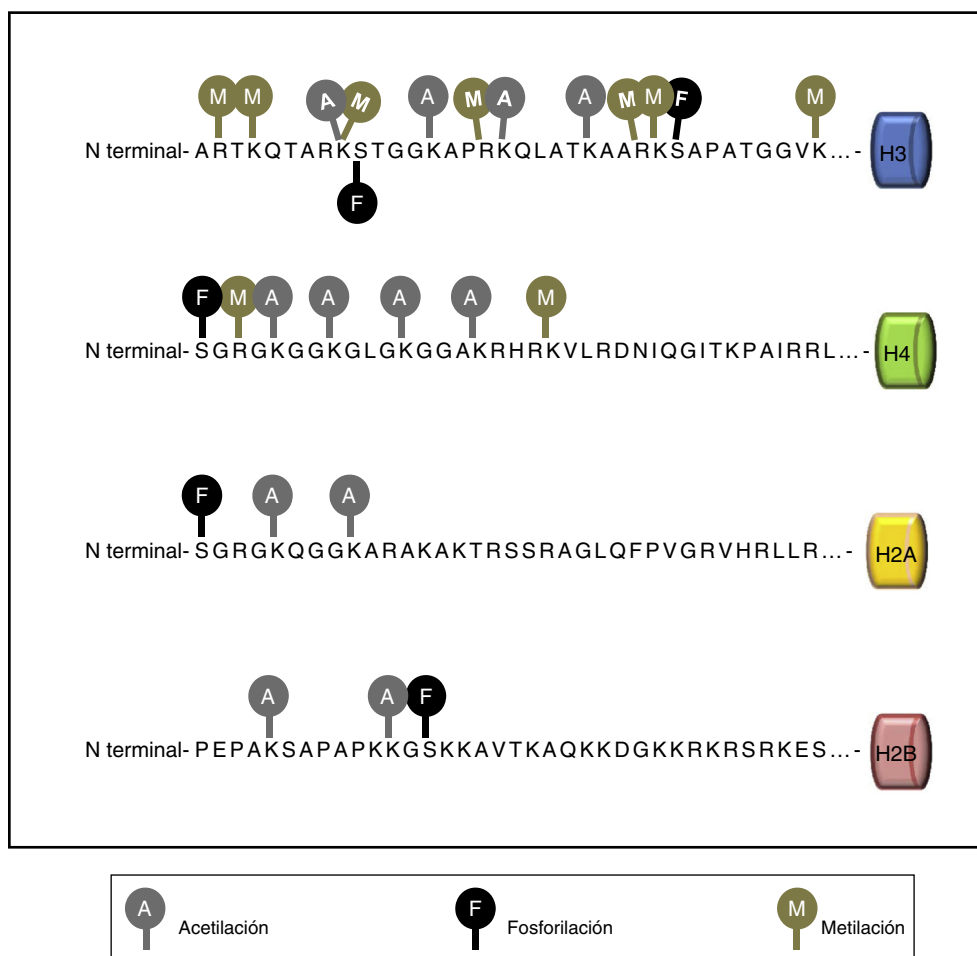
Las principales marcas de modificaciones de histonas están resumidas en la [tabla 1](#) y la [fig. 2](#).

El grado de acetilación de las histonas es un proceso modulado por las enzimas acetilasa de histonas (HAT) y deacetilasa de histonas (HDAC) y, en el caso del grado de metilación de las histonas, el proceso está mediado por las enzimas metiltransferasa de histonas (HMT) y demetilasa de histonas (HDM).

**Tabla 1** Principales modificaciones en las histonas

Modificación	Papel en la transcripción	Histona	Residuo modificable
Acetilación	Activación	H3	K9, K14, K18, K56
		H4	K5, K8, K12, K16
		H2A	K5
		H2B	K6, K7, K16, K17
Metilación	Activación	H3	K4, K36, K79
	Represión	H3	K9, K27
		H4	K20
		H2A	K120
Fosforilación	Activación	H3	S10
Ubiquitinización	Activación	H2B	K120
	Represión	H2A	K119

El número se refiere al número de aminoácido en la cadena de la histona.  
 K: residuo de lisina, S: residuo de serina.



**Figura 2** Representación de las principales modificaciones en las histonas.

Como ya hemos comentado, la metilación del ADN y las modificaciones de las histonas son las principales marcas epigenéticas y las más estudiadas sobre todo con relación al desarrollo de cáncer, pero también son responsables de regular procesos implicados en la patogenia de la arteriosclerosis.

En células endoteliales se ha demostrado que las LDL oxidadas inducen la acetilación de la histona 4, y la fosforilación y acetilación de la histona 3 (marcas epigenéticas

asociadas a activación de la expresión génica), y muestran como estas modificaciones de histonas son responsables de aumentar la expresión de citocinas proinflamatorias como IL8 y MCP1. Este proceso se puede controlar gracias al tratamiento previo de las células endoteliales con estatinas<sup>9</sup>.

El butirato es un ácido graso de cadena corta subproducto de la digestión de la fibra dietética y también es un conocido inhibidor dietético de HDAC que inhibe la proliferación de las

células musculares lisas vasculares (CMLV) y, recientemente, se ha descrito que este proceso tiene lugar a través de modificaciones en las histonas, más concretamente acetilando, fosforilando y metilando residuos aminoácido de la histona 3. Estas modificaciones modulan la expresión de genes implicados en el ciclo celular y reprimen la proliferación de las CMLV<sup>10</sup>.

En un modelo animal de arteriosclerosis, con un ratón deficiente en apoE, se describió que las células musculares lisas están hipometiladas globalmente en la lesión arteriosclerótica<sup>11</sup>, y que la arteriosclerosis se asocia con un reajuste de los patrones de metilación ya sea por hipoor por hipermetilación, en los diferentes tejidos diana en el desarrollo de la arteriosclerosis<sup>12</sup>.

Comparando el grado de metilación en dinucleótidos CpG repartidos a lo largo de todo el genoma de aortas sanas y aortas afectas de arteriosclerosis obtenidas post mórtem del mismo individuo, Zaina et al.<sup>13</sup> han descrito que en las aortas con lesión arteriosclerótica hay un patrón de metilación del ADN global alterado de manera que encuentran más regiones hipermetiladas en las aortas afectas. Analizando en detalle las zonas diferencialmente metiladas en arteriosclerosis, han identificado CpG localizados en varios genes implicados en la homeostasis vascular controlando, por ejemplo, la migración de monocitos (PDGFD y MYH10); estimulando la angiogénesis (MIR23b y HOXB3); controlando la proliferación de las CMLV (RPTOR), su señalización (PTK2, EGFR, TSC22D1 y PRKCE) y su contracción (KCNMA1 y CALD1); y participando en el estado y calcificación de la placa (FBN2, A2BP1 y PLA2G10).

Existen otros ejemplos en la bibliografía que han descrito cambios en el patrón de metilación del ADN o de modificaciones en histonas, en genes implicados en procesos clave en el desarrollo de arteriosclerosis como son la disfunción endotelial, el control de la inflamación y oxidación, y el metabolismo de los lípidos, entre otros (resumidos en la tabla 2).

## ARN no codificantes como reguladores epigenéticos

La finalización del Proyecto Genoma Humano en 2003 permitió identificar que solo menos del 2% del genoma humano se utiliza para codificar proteínas. La mayoría del genoma se transcribe activamente para producir transcritos no codificantes. Los ARN no-codificantes son moléculas de ARN funcionales que, aunque no codifican para proteínas, son clave en la regulación génica.

La transcripción del genoma en diferentes formas de ARN, incluyendo los ARN no codificantes (ARNnc), está bien establecida en la actualidad. Los ARNnc se consideran marcas epigenéticas debido a que participan en el control de la expresión génica sin implicar cambios en la secuencia de nucleótidos o en el número de copias del ADN. Sin embargo, el mecanismo de acción de los ARNnc difiere del que se ha descrito anteriormente para las otras marcas epigenéticas (metilación del ADN, modificación de histonas). Así, los ARNnc no producen cambios sobre la molécula de ADN sino que se encargan de controlar la expresión génica de manera postranscripcional uniéndose a ARN mensajeros (ARNm) diana y, de esta forma, promoviendo o bien su

degradación, o inhibiendo su traducción, evitando en los 2 casos la expresión génica. De esta forma los ARNnc reguladores pueden contribuir de manera importante en el control epigenético de la expresión génica.

Los ARNnc mejor estudiados y caracterizados son los microARN (miR) que se encargan de ajustar y dirigir finamente la traducción de hasta un 60% de los genes codificantes de proteínas en humanos<sup>14</sup>. Los miR maduros y funcionales son moléculas pequeñas de ARN de cadena sencilla de aproximadamente 22 nucleótidos que están codificados en el genoma y cuya biogénesis está altamente regulada (fig. 3). Así, los genes codificantes de los miR se transcriben inicialmente como miR primarios (pri-miR) de cadena larga por acción de la ARN polimerasa III. Estos son procesados en el núcleo por un complejo de proteínas, entre las que destaca Drosha, para formar estructuras de aproximadamente 70 nucleótidos denominadas miR precursores (pre-miR). Los pre-miR resultantes son seguidamente transportados al citoplasma a través de exportina 5 donde son procesados por una segunda RNasa III denominada Dicer que genera complejos de doble cadena del tamaño de los miR maduros (22 nucleótidos). De las 2 cadenas del complejo preferentemente se selecciona una como miR maduro, conocida como cadena guía, para integrarse en el complejo RNA-induced silencing complex (RISC) encargado de producir el silenciamiento génico, mientras que la otra cadena, denominada pasajera, normalmente se degrada. Sin embargo, en muchos casos las 2 cadenas son biológicamente activas y funcionan como miR diferentes. En este caso los 2 miR maduros provienen del mismo pre-miR y son denominados como 5p y 3p en función de la cadena a partir de la cual se generan. El complejo RISC-miR se une específicamente a regiones complementarias situadas en la zona 3' UTR de los ARNm diana, promoviendo principalmente su desestabilización y degradación cuando la unión es por complementariedad perfecta o, en ocasiones, su represión de la traducción cuando la unión es por complementariedad parcial (fig. 3). La especificidad y funcionalidad de los miR están determinadas por la llamada región «semilla» del miR constituida por los nucleótidos 2 a 7 de la región 5' de cada miR maduro. Esta región debe ser obligatoriamente complementaria al ARNm diana<sup>15</sup> mientras que el resto puede tener complementariedad parcial. Este hecho permite que los miR individuales puedan actuar inhibiendo múltiples ARNm<sup>16</sup> de manera que la alteración de un solo miR puede resultar en diferentes fenotipos. Además, un ARNm individual puede contener diferentes dianas de unión para distintos miR, resultando todo ello en una compleja red reguladora<sup>17</sup>.

Además de los miR, existen los ARN no codificantes largos (lncARN del inglés) formados por más de 200 nucleótidos que también funcionan como reguladores epigenéticos importantes y que en diferentes estudios se han descrito como reguladores del fenotipo vascular<sup>18,19</sup>. Esta regulación se lleva a cabo básicamente dentro del núcleo celular mientras que el control por parte de los miR es básicamente citoplasmático<sup>20</sup>. Entre los lncARN podemos destacar *Fendrr*, *CHRF*, *Anril*, o *Malat1* que regulan procesos tales como la expresión génica cardíaca, la diferenciación de miocitos, la hipertrofia cardíaca, la angiogénesis o la susceptibilidad a enfermedad cardiovascular<sup>21-24</sup>.



**Tabla 2** Genes relacionados con la arteriosclerosis que son regulados epigenéticamente

Proceso	Gen	Modificación epigenética	Referencia
Disfunción endotelial	eNOS	Modificación de histonas	106
Disfunción endotelial	iNOS	Metilación del ADN	107
Disfunción endotelial	ER- $\beta$	Metilación del ADN	108
Disfunción endotelial	EC-SOD	Metilación del ADNModificación de histonas	95,109
Apoptosis	p53	Metilación del ADN	110
Matriz extracelular	MMP-2	Metilación del ADN	111
Matriz extracelular	MMP-7	Metilación del ADN	111
Matriz extracelular	MMP-9	Metilación del ADN	111
Matriz extracelular	TIMP-3	Metilación del ADN	112
Proliferación celular	IGF2	Metilación del ADN	113
Proliferación celular	PDGF-A	Metilación del ADN	114
Proliferación celular	VEGFR2	Modificación de histonas	115
Inflamación	IFN- $\gamma$	Metilación del ADN	116
Inflamación	IL10	Modificación de histonas	117
Inflamación	IL8	Modificación de histonas	9
Inflamación	MCP-1	Metilación del ADN	118
Inflamación	MCP-1	Modificación histonas	118
Inflamación	TNF- $\alpha$	Modificación histonas	119
Inflamación	VCAM-1	Modificación histonas	119
Inflamación	ICAM-1	Metilación del ADN	120
Metabolismo de lípidos y lipoproteínas	Fads2	Metilación del ADN	121
Metabolismo de lípidos y lipoproteínas	apoA1-C3-A4-A5	Metilación del ADN	122
Metabolismo de lípidos y lipoproteínas	LCAT	Metilación del ADN	123
Metabolismo de lípidos y lipoproteínas	LPL	Metilación del ADN	123
Metabolismo de lípidos y lipoproteínas	CETP	Metilación del ADN	123
Metabolismo de lípidos y lipoproteínas	LDLR	Metilación del ADN	123
Metabolismo de lípidos y lipoproteínas	ABCA1	Metilación del ADN	94,124-126
Metabolismo de lípidos y lipoproteínas	PLA2G7	Metilación del ADN	127

Recientemente se ha añadido un nivel más de complejidad al demostrarse la regulación epigenética de las marcas epigenéticas, es decir, se ha descrito una intercomunicación entre mecanismos epigenéticos. Concretamente, metilaciones en islas CpG de regiones reguladoras de miR así como modificaciones en histonas se han implicado en la patogénesis de diferentes enfermedades<sup>25-29</sup> alterando la expresión de miR y regulando los mARN diana<sup>30-33</sup>. Además los mismos miR son capaces de controlar la metilación del ADN y la modificación de histonas mediante la regulación de la expresión de genes que controlan estas rutas epigenéticas. Así, se ha descrito que miR-1 promueve la miogénesis actuando sobre HDAC4 y miR-29 tiene como diana la ADN metiltransferasa DNMT3A<sup>25,29,34</sup>. Es interesante destacar que estos cambios epigenéticos pueden ser causados por una variedad de factores tales como químicos, fármacos, edad y dieta<sup>35</sup>.

La intercomunicación entre miR y los factores de transcripción clásicos también está bien establecida ya desde los primeros estudios de predicción de las dianas de los miR cuando se estableció la preferencia de estos factores de transcripción como dianas de actuación de los miR<sup>36</sup>. Además, la expresión de los miR puede estar regulada por factores de transcripción, de manera que se crean circuitos de control con regulación positiva o negativa<sup>37</sup>.

En la actualidad hay descritos más de 1.000 miR en humanos. En los últimos años se ha ido describiendo el papel importante que estos juegan en las enfermedades

cardiovasculares, no solo como moléculas implicadas en la patogenia de los diferentes fenotipos cardiovasculares, sino que también como posibles biomarcadores de riesgo y progresión de enfermedades cardíacas como infarto agudo de miocardio, enfermedad cardiovascular o insuficiencia cardíaca<sup>18,38-53</sup>. En este sentido, un resultado importante que explica la función crucial de los miR en el desarrollo del sistema cardiovascular es el que describe que la eliminación en ratones de Dicer (la RNasa que procesa los pre-miR) conlleva defectos en angiogénesis, formación de vasos y desarrollo cardíaco<sup>54</sup>.

### Micro ARN y arteriosclerosis

El interés en el estudio de los miR ha permitido que se hayan relacionado con muchos de los procesos o mecanismos básicos implicados en el desarrollo de arteriosclerosis. Así, se ha demostrado que los miR funcionan como controladores clave de la expresión génica, y, por lo tanto, de la funcionalidad, de los diferentes tipos celulares implicados en la arteriosclerosis (células endoteliales, células musculares lisas vasculares, monocitos y macrófagos). Además, se han implicado en el control de procesos tales como la inflamación, el metabolismo cardíaco y lipoproteico, la biosíntesis y captación de colesterol, el remodelaje cardíaco, la disfunción endotelial, la angiogénesis o en la diferenciación, migración y proliferación celular. Una exhaustiva relación de todos los

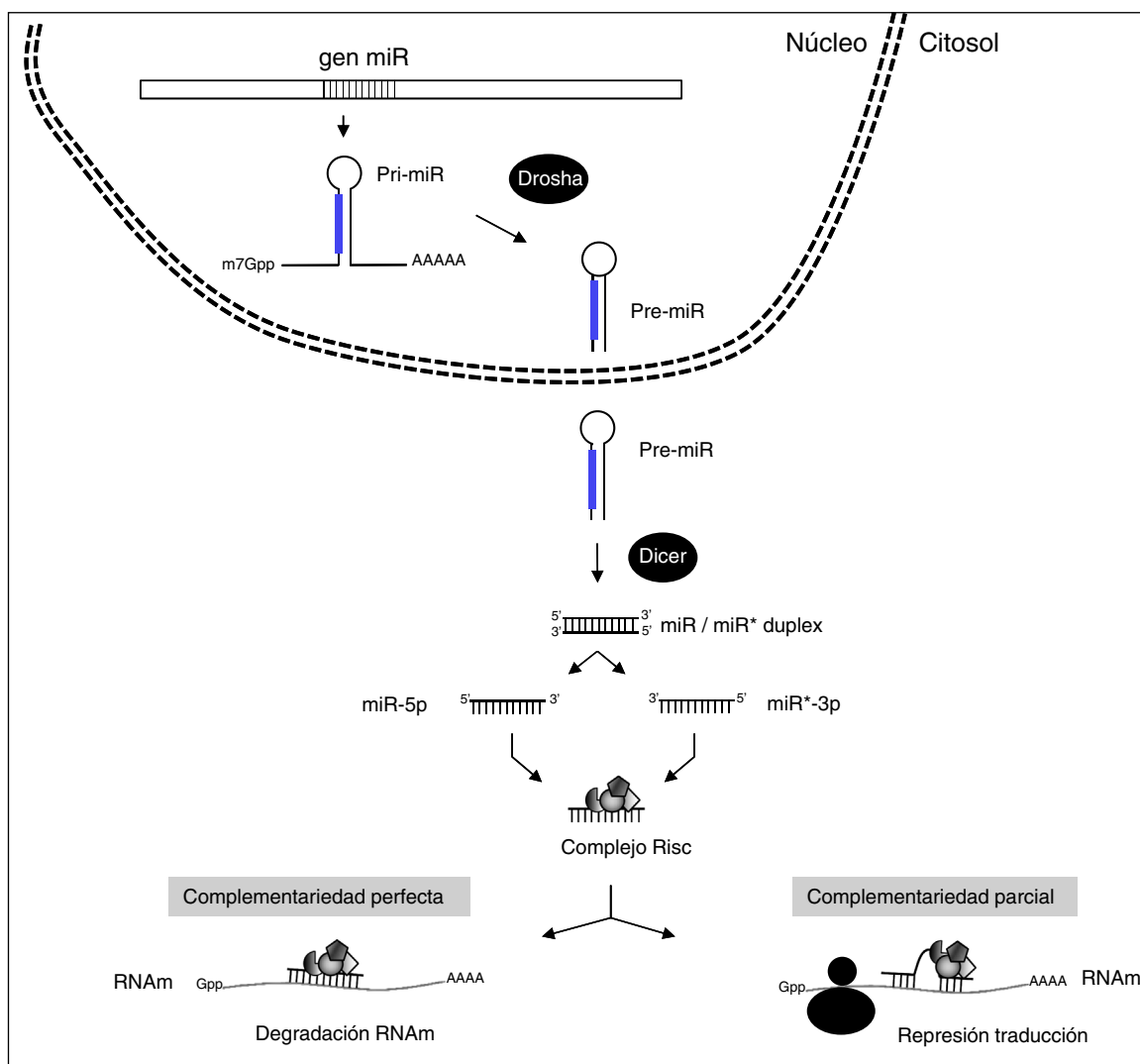


Figura 3 Formación y mecanismos de acción de los miRs.

miR implicados en estos procesos así como de los detalles de los genes diana y sus mecanismos han sido magníficamente revisados muy recientemente y están resumidos en la tabla 3<sup>55</sup>. Así, se ha descrito que tanto miR-33a como miR-324 reprimen la expresión de diferentes genes implicados en el eflujo de colesterol como por ejemplo ABCA1, de manera que tanto la inhibición de miR-33, como el déficit del gen en ratones aumenta los niveles de colesterol HDL, atenúan la progresión de arteriosclerosis y aumentan su regresión<sup>56-58</sup>. Además, en ratones deficientes de apoE, la ausencia de miR-33 reduce marcadamente la lesión arteriosclerótica que desarrollan estos ratones. También se ha descrito que la sobreexpresión hepática de miR-30c en ratones produce una reducción importante del colesterol plasmático, mejorando así la progresión de arteriosclerosis<sup>59</sup>. Por otra parte, también se han descrito efectos de miR sobre el endotelio vascular. Así se ha demostrado que la administración de miR-126 en ratones reduce el tamaño de la placa arteriosclerótica a través de disminuir el contenido en macrófagos y células apoptóticas debido a una disminución de VCAM endotelial<sup>60</sup>. De forma similar, miR-31, miR-17-3p

y miR-21 regulan en células endoteliales los niveles de VCAM-1, ICAM-1 y E-selectina<sup>61</sup>. Otras señales proinflamatorias como la ruta de señalización de NF-κB están inhibidas por miR-10a<sup>62</sup> y miR-181b<sup>63</sup>, que actúan sobre las subunidades encargadas de translocar NF-κB al núcleo. En concreto, la inhibición de importina α3 por parte de miR-181b resulta en una reducción de la arteriosclerosis presente en ratones deficientes de apoE<sup>64</sup>. Por otra parte, los miR regulan tanto la diferenciación como la proliferación de las células musculares lisas, procesos clave en el desarrollo de arteriosclerosis. Así, miR-21 y miR-143/145 regulan la diferenciación de estas células actuando respectivamente sobre tropomiosina<sup>165</sup> o PPARα<sup>66</sup> y sobre KLF4, ELK-1 o Krüppel-like factor<sup>67-70</sup>.

Además, se ha descrito que una expresión génica anómala asociada a niveles alterados de miR es un determinante de muchos fenotipos patológicos tales como dislipidemia, resistencia a insulina, obesidad o diabetes<sup>17</sup>. En estos casos los miR actúan regulando el metabolismo en los órganos responsables de estos procesos tales como el páncreas, el hígado o el tejido adiposo<sup>17</sup>.

**Tabla 3** MicroARN implicados en el desarrollo de la arteriosclerosis

Tipo celular/ proceso	MicroARN	mARN diana	Función	Referencias	
Metabolismo lipídico	miR-33a/b	ABCA1, ABCG1, CPT1A, CROT, HADHB	Eflujo de colesterol, β-oxidación de ácidos grasos	128,129	
	miR-144, miR-758, miR-106 miR-30c	ABCA1	Eflujo de colesterol	130-132	
		MTP, LPGAT1	Síntesis de colesterol, secreción de lipoproteínas	133	
Macrófagos	miR-155	LX1, CD36, CD68, MyD88, BCL6	Captación de lípidos e inflamación	134-136	
	miR-125a-5p	ORP9	Captación de lípidos e inflamación	137	
	miR-146a miR-147	TLR4	Respuesta TH1 Inflamación	138 139	
Células musculares lisas vasculares	miR-9 miR-21	PPARδ TPM1, PDCD4, PPARα	Inflamación Proliferación, migración y apoptosis	140 65,66,141	
	miR-143/145 miR-1/33 miR-221/222	KLF4, KLF5, ELK-1 KLF4, Sp-1 P27, p57, c-KIT	Cambio fenotípico, podosomas Proliferación Proliferación, migración y apoptosis	67-69 142-144 145,146	
	miR-29 miR-208 let-7 d let-7 g miR-132 miR-133a miR-181a	Elastina p21 KRAS LOX-1 LRRF1P1 RUNX2 Osteopontina	Formación de elastina Proliferación Proliferación Proliferación y migración Proliferación Diferenciación osteogénica Adhesión y formación de osteopontina	147,148 149 150 151,152 153 154 155	
	Células endoteliales	miR-126	SPRED1, VCAM-1	Adhesión de monocitos	156
		miR-17-39, miR-31 miR-92a	ICAM-1, E-selectina Enos, KLF2, KLF4, SOCS5	Inflamación Vasodilatación e inflamación	61 157,158
		miR-155, miR-221/222 miR-712 miR-10 miR-181b miR-27	ENOS, ETS1 TIMP3 VCAM-1, E-selectina Importina α3 SEMA6A	Inflamación Inflamación Inflamación Adhesión de células endoteliales, angiogénesis	159,160 161 62 156 162,163
		miR-34a, miR-217 miR-146	SIRT-1 NOX4, HUR	Senescencia Activación celular endotelial y envejecimiento	164,165 166,167
		let-7g	CASP-3 SIRT-1, TGF-β	Apoptosis, inflamación, angiogénesis	151,167

### Micro ARN circulantes

Además de regular dianas intracelulares, se ha descrito que los miR están presentes en sangre a concentraciones fisiológicamente significativas. A pesar de que los estímulos que activan la secreción de los miR a la circulación no están claros, los miR circulantes pueden transportarse de forma estable y ser entregados a células destino<sup>60,71</sup> gracias a su

incorporación a cuerpos apoptóticos<sup>60</sup>, exosomas<sup>72</sup>, a partículas de HDL<sup>73</sup> y a la formación de complejos con argonata 2<sup>74</sup>. Se necesitan más estudios para clarificar si los miR endógenos circulantes pueden ser dirigidos a células diana para facilitar la comunicación entre diferentes órganos y regular así la expresión génica a nivel sistémico. Sí está mucho más estudiado el papel de los miR circulantes como biomarcadores específicos de enfermedad. Los niveles de expresión



Tabla 4 MicroARN asociados a obesidad, DMT2 e hipertensión

Enfermedad		MicroARN	Fuente	Referencias
Obesidad	+	miR-17-5p, miR-132	Sangre total	168
	-	miR-21, miR-27b, miR-103, miR-155	Sangre total	169
	+	miR-15b	Suero	170
	-	miR-138, miR-376a, miR-503		
Obesidad mórbida	+	miR-130b	Suero	171
	+	miR-140-5p, miR-142-3p, miR-222	Plasma	172
	-	miR-15a, miR-125b, miR-130b, miR-221, miR-423-5p, miR-520c-3p, miR-532-5p		
Obesidad infantil	+	miR-16-1, miR-122, miR-130b, miR-140-5p, miR-142-3p, miR-222, miR-363, miR-423-5p, miR-486-3p, miR-486-5p, miR-532-5p	Plasma	173
	-	miR-28-3p, miR-125b, miR-221, miR-328		
DMT2	+	miR-503	Plasma	174
	+	miR-146a	Plasma	175
	+	miR-29a, miR-144, miR-150, miR-192, miR-320a	Sangre total	176
	-	miR-30d, miR-146a, miR-182		
	+	miR-9, miR-29a, miR-30d, miR-34a, miR-124, miR-146, miR-375	Suero	177
	+	miR-28-3p	Plasma	178
	-	miR-15a, miR-20b, miR-21, miR-24, miR-29b, miR-126, miR-150, miR-191, miR-197, miR-223, miR-320, miR-486		
	+	miR-146	Plasma	179
	-	miR-503	Suero	179
Hipertensión	+	Let-7e, hcmv-miR-UL112	Plasma	180
	-	miR-296-5p		

en sangre o en plasma de miR específicos están alterados de manera significativa en diferentes enfermedades cardiovasculares como el infarto agudo de miocardio o la insuficiencia cardíaca, así como en obesidad, hipertensión y diabetes mellitus tipo 2 (DMT2). El reto en este tipo de estudios está en identificar de forma precisa y reproducible miR específicos o un conjunto de ellos que puedan utilizarse como biomarcadores de riesgo o de progresión de enfermedad y que permitan identificar a aquellos pacientes susceptibles de desarrollar la enfermedad. Existen muchos estudios que han planteado este objetivo aunque en la actualidad los resultados son poco consistentes entre ellos. En la [tabla 4](#) adaptada de Price et al.<sup>17</sup> se resumen los miR más significativos asociados con obesidad, DMT2 e hipertensión y en la [tabla 5](#) se detallan aquellos implicados en infarto agudo de miocardio, en enfermedad coronaria arterial e insuficiencia cardíaca. El papel de los miR en esta última enfermedad se ha estudiado extensamente. En los últimos años diferentes estudios han demostrado una función importante de los miR en la patogénesis de la insuficiencia cardíaca. Por ejemplo se ha propuesto un patrón de expresión de miR específico para diferentes etiologías de insuficiencia cardíaca. Así, 43 miR estaban diferencialmente expresados en miocardiopatía mientras que 13 eran específicos de estenosis aórtica<sup>75</sup>. La sobreexpresión *in vitro* de diferentes miR individuales que se han descrito sobreexpresados en HF (miR-23a, -23b, -24,

-195 o -214) inducía hipertrofia cardíaca. La sobreexpresión de miR-133 que se ha descrito reprimida en HF inhibía la hipertrofia cardíaca, mientras que su supresión la promovía tanto *in vivo* como *in vitro*<sup>76,77</sup>.

Finalmente, está descrito que algunos miR (miR1, 133a y 499) pueden aumentar la proliferación y la diferenciación de cardiomiocitos humanos provenientes de células madre embrionarias o de células progenitoras humanas<sup>78,79</sup>. Además, utilizando estos miR específicos se puede aumentar la reprogramación de fibroblastos adultos directamente en células con linaje cardiomiocítico<sup>80</sup>. También se ha descrito que una sobreexpresión del clúster miR-17-92 en ratones aumenta la proliferación de células progenitoras cardíacas y facilita la regeneración cardíaca después de un infarto agudo de miocardio<sup>53</sup>. Así, es posible pensar que estos miR puedan convertirse en dianas terapéuticas para la reparación del daño cardíaco y la regeneración del corazón aunque para ello todavía es necesario mejorar la tecnología de entrega de estos miR a sus células diana para evitar inhibiciones o activaciones inespecíficas de otros miR y hacer frente a posibles problemas de seguridad.

### Metilación del ARN

Desde hace ya unos años se están describiendo modificaciones en el ARN que pueden funcionar como reguladoras

**Tabla 5** MicroARN asociados a infarto agudo de miocardio, enfermedad coronaria arterial e insuficiencia cardíaca

Enfermedad		MicroARN	Región	Referencias
Infarto agudo de miocardio	+	miR-1, miR-133a, miR-208b, miR-499-5p	Plasma	181
		miR-233,		
	–	miR-122, miR-375	Plasma	182
	+	miR-423-5p	Plasma	183
	–	miR-663-b, miR-1291	PBMC	184
	+	miR-30c, miR-145		
	+	miR-133, miR-328	Plasma	185
	–	miR-126	Plasma	186
	–	miR-150	Plasma	187
	+	miR-155, miR-380	Suero	188
Enfermedad arterial coronaria	–	miR-17-92 clúster, miR-126, miR-145, miR-155,	Plasma	189
		miR-133, miR-208a		
	+	miR-92a, miR-126, miR-133a, miR-208a, miR-499,	Plasma	190
		miR-221, miR-222		
	+	miR-146a/b	PBMC	191
	+	miR-134, miR-135a, miR-198, miR-370	PBMC	192
		miR-147		
	–	miR-147		
	+	miR-1, miR-126, miR-485-3p, miR-133a, miR-126, miR-337-5p, miR-145	Plasma	194
		miR-340, miR-624		
Insuficiencia cardíaca	+	miR-126	Plaquetas	195
	+	miR-126	Plasma	196
	+	miR-423-5p, miR-18, miR-129-5p, miR-622, miR-1254	Plasma	197
	+	miR-423-5p, miR-320a, miR-22, miR-92b	Suero	198
	–	miR-103, miR-142-3p, miR-30b, miR-342-3p	Plasma	199
	+	miR-499, miR-210	Plasma	200,201
	–	miR-126	PBMC	202
	+	miR-15a/b, miR-20a, miR-103, miR-130a/b, miR-195, miR-210, miR-301, miR-451, miR-494	Plasma	201
	+	miR-210, miR-30a	Suero	203
+	miR-133a, miR-21	Plasma	204,205	

PBMC: células mononucleadas de sangre periférica.

de la expresión génica a nivel postraducciona, pero aún se conoce poco.

Una de las modificaciones más estudiadas es la metilación del ARN que puede tener lugar en diferentes posiciones en el nucleótido de tARN, mARN y rARN.

La metilación del ARN tiene diferentes consecuencias funcionales como estabilización, aumento en la función y control de calidad.

Uno de los principales residuos modificados en el mARN es la metilación en posición 6 de la adenosina (m6A), proceso en el que SAM también es el donador del grupo metilo, y se ha demostrado que es una modificación dinámica que juega

un papel importante en obesidad y DMT2<sup>81</sup> al igual que en ciertos tipos de cáncer y enfermedades mentales.

### Impronta genética y «memoria celular» en épocas tempranas de la vida

La impronta es un mecanismo epigenético reversible especialmente importante en mamíferos. La impronta afecta la expresión de algunos, no todos, los genes, y se caracteriza por la expresión de solo uno de los alelos (el alelo que proviene de la madre o el que proviene del padre). El alelo

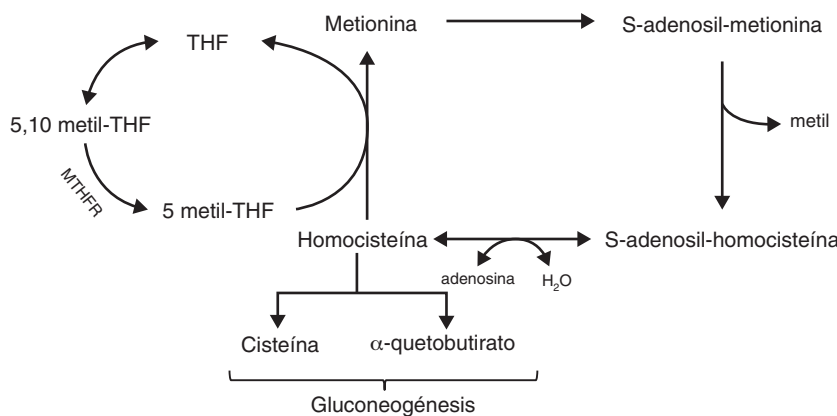


Figura 4 Ciclos del folato, la metionina y la transulfuración, en la formación de SAM.

inactivo es el imprintado y el silenciamiento tiene lugar principalmente mediante metilación de la región del ADN que contiene el gen imprintado.

La impronta tiene lugar en los gametos. En estas células, los patrones originales son borrados y solo uno específico, el materno o el paterno, es reestablecido.

En el gen imprintado solo uno de los alelos funciona. Por lo tanto, ante una situación de pérdida de función del alelo activo, este no podrá ser compensado por el otro.

Los genes imprintados tienen papeles clave en el desarrollo prenatal, en el comportamiento e incluso en el desarrollo de enfermedades en humanos como cáncer, obesidad, o diabetes. Por ejemplo, la administración de una dieta rica en grasas en ratones afectaba al peso corporal de la tercera generación de su descendencia y este efecto solo era observable en las hembras, lo que indica que la influencia ambiental sobre el desarrollo del peso corporal puede ser responsable de loci imprintados<sup>82</sup>.

Conocidos síndromes pediátricos son debidos a procesos de impronta, como el Prader-Willi o Angelman que son debidos a errores genéticos y epigenéticos en el cromosoma 15.

Aproximadamente unos 100 genes humanos están imprintados y la mayoría se localizan en los cromosomas 6, 7, 11, 14, 15 y 20.

## Dieta y folato/homocisteína

El grado de expresión de un gen ya hemos visto que viene determinado, en parte, por mecanismos epigenéticos, y estos pueden alterarse como consecuencia de influencias ambientales. Es decir que las interacciones gen-ambiente son mediadas por modificaciones epigenéticas, y los cambios epigenéticos suelen aparecer en respuesta a cambios en el ambiente como cambios en el estado nutricional, y esto es especialmente relevante en enfermedades complejas como el cáncer, la diabetes o la enfermedad cardiovascular, debido a que su desarrollo tiene un origen genético influido por un fuerte componente ambiental y de estilo de vida.

Los grupos metilos son adquiridos a través de la dieta y son donados al ADN a través de la vía del folato y de la metionina.

Los factores dietéticos son necesarios para generar SAM que es el donador principal de grupos metilo. Los nutrientes ricos en grupos metilos incluyen: vitaminas como el folato, la

riboflavina, vitamina B<sub>12</sub>, vitamina B<sub>6</sub> y colina; y aminoácidos como la metionina, la cisteína, la glicina y la serina.

La formación de SAM implica 3 vías bioquímicas interrelacionadas: el ciclo del folato, el ciclo de la metionina y la vía de transulfuración (fig. 4)<sup>83</sup>.

## Ciclo del folato

El folato es una vitamina B hidrosoluble cuya forma activa es el tetrahidrofolato (THF) que se utiliza en la formación de purinas y pirimidinas, y la remetilación de homocisteína a metionina.

Para la formación de purinas y pirimidinas el THF es convertido en 5,10-metil-THF que gracias a la MTHFR se convierte en 5-metil-THF.

## Ciclo de la metionina

La metionina es un aminoácido que se convierte en SAM (principal donador de grupos metilo al ADN, ARN, proteínas, fosfolípidos...) gracias a la metionin-adenosiltransferasa. Cuando SAM dona su metilo, se forma el S-adenosil-homocisteína (SAH) y, tras la liberación del grupo adenosil, obtenemos la homocisteína.

La homocisteína es un aminoácido no implicado en la síntesis de proteínas que puede ser remetilado a metionina gracias a la donación del grupo metilo por parte de la 5-metil-THF o puede ser catabolizado a cisteína a través de la vía de transulfuración.

## Vía de la transulfuración

La homocisteína puede ser convertida en cisteína y  $\alpha$ -quetobutirato que tras varias reacciones serán convertidos en piruvato y succinil CoA necesarios en la gluconeogénesis.

Con relación a la enfermedad cardiovascular, tanto estudios epidemiológicos como clínicos han mostrado una asociación entre la homocisteína y la incidencia de arteriosclerosis. La homocisteína es un factor de riesgo cardiovascular independiente de otros factores de riesgo cardiovascular<sup>84,85</sup>.

El déficit en la ingesta dietética de folato resulta en hiperhomocisteinemia que acelera la arteriosclerosis por distintas vías:

- causa estrés oxidativo<sup>86</sup>
- tiene efectos proinflamatorios
- altera el metabolismo lipídico
- altera la función endotelial, promoviendo disfunción endotelial<sup>87,88</sup> y alterando la función plaquetar e induciendo trombosis<sup>89</sup>
- estimula la proliferación de CMLV.

La relación entre la homocisteína y el riesgo cardiovascular también implica mecanismos de control epigenéticos.

Dos estudios en mujeres posmenopáusicas que recibían una dieta baja en folato mostraron que tenían bajos niveles circulantes de folato, altos niveles de homocisteína y un descenso en el grado de metilación global del ADN en linfocitos<sup>90</sup> y en leucocitos<sup>91</sup>.

El polimorfismo 677C > T en el gen MTHFR (rs1801133) se asocia a una incapacidad de sintetizar 5-metil-HF y por ello se asocia a niveles altos de homocisteína y hipometilación global del ADN<sup>92,93</sup>.

En monocitos cultivados, cambios en la concentración de homocisteína aumentan los niveles de metilación en ABCA1 y disminuyen los niveles de metilación en ACAT1. Por ello, la metilación del ADN de ABCA1 y de ACAT1 inducida por la homocisteína posiblemente juega un papel importante en la expresión de ABCA1 y ACAT1 y en la acumulación de colesterol en las células espumosas<sup>94</sup>.

En monocitos también se ha descrito que la hiperhomocisteinemia induce una metilación en la superóxido dismutasa extracelular (EC-SOD), así como aumento en la acetilación de la histona 3 y la histona 4<sup>95</sup>.

La ratio SAM/SAH define el potencial de metilación de una célula. La hiperhomocisteinemia disminuye esta ratio y hace disminuir el potencial metilador.

## La epigenética en la arteriosclerosis: presente y futuro

La epigenética ha tenido una trayectoria interesante en el contexto de la biología y la biomedicina. Hace solo 2 décadas, la epigenética era una disciplina exclusiva de pocos biólogos del desarrollo embrionario que buscaban un mecanismo molecular para explicar el enigma de la impronta genómica, es decir el fenómeno por lo cual un alelo está expresado o no dependiendo solamente del sexo del progenitor del cual proviene<sup>96</sup>. Esos estudios han plasmado una definición inicial de la epigenética como el estudio de mecanismos de regulación transcripcional independiente de la secuencia del ADN. Además, el hallazgo inicial de que los mecanismos de impronta genómica (expresión exclusivamente paterna) en el gen *IGF2* están atenuados en tumores de Wilms<sup>97</sup> marcó el punto de partida de la epigenética en la biología del cáncer, seguramente la enfermedad en la cual los mecanismos epigenéticos han sido estudiados de manera más intensa y sistemática. En el área cardiovascular, 2 hallazgos fundamentales en años recientes han contribuido a despertar un creciente interés en la epigenética. Primero, el grupo de Jirtle demostró que la dieta puede

modificar el epigenoma y la expresión génica de manera estable<sup>98</sup>. Segundo, el trabajo de Tycko et al. descubrió que por lo menos parte de la información epigenética es alelo-dependiente, lo que implica una interacción entre la información genética y la epigenética<sup>99</sup>. Estos descubrimientos condujeron a suponer, por un lado, que los factores de riesgo cardiovascular como la dieta, el estilo de vida y otros pueden actuar imponiendo un epigenoma anormal que, a su vez, resulta en un patrón transcripcional aterogénico. Por otro lado, justificaron la idea de que la «missing heritability», evidenciada en las enfermedades cardiovasculares por los estudios de asociación genética, podría ser explicada por la herencia de patrones epigenéticos o por una interacción entre variantes genéticas y epigenoma<sup>100</sup>. La literatura científica reciente de epigenética cardiovascular parte de estas hipótesis, específicamente, los esfuerzos para describir el epigenoma de la lesión aterosclerótica y por controlar la progresión del ateroma a través de la administración de modificadores epigenéticos. Hasta la fecha, trabajos independientes han demostrado de manera convincente que el ADN de la pared vascular aterosclerótica está hipermetilado y que la inhibición bioquímica de las ADN metiltransferasas disminuye el tamaño del ateroma<sup>12,101,102</sup>. Indudablemente, estos hallazgos justifican la búsqueda de estrategias clínicamente viables para mantener o revertir la metilación del ADN del tejido vascular aterosclerótico a niveles normales. Los retos inmediatos a los que cualquier proyecto de terapia epigenética cardiovascular se enfrenta son la especificidad del tratamiento y la identificación de un número limitado de blancos genómicos que permitan el eficiente control de la expresión de genes críticos. Una complicación en este aspecto es que la mayoría de la hipermetilación del ADN del ateroma se encuentra en el interior de los genes («gene body») y que poco se sabe sobre la regulación transcripcional por parte de la metilación intragénica<sup>12</sup>. Sin duda, el progreso de los estudios básicos de epigenética será fundamental para lograr terapias epigenéticas cardiovasculares exitosas. Igualmente importantes han sido los estudios recientes de *Epigenome-Wide Association Studies* (EWAS), que pretenden identificar asociaciones entre factores de riesgo y patrones epigenéticos en muestras de gran tamaño. Estos importantes estudios identificaron un pequeño número de sitios del genoma cuyo estado de metilación está significativamente asociado con la variación de la insulinemia, VLDL/triglicéridos e IMC<sup>103-105</sup>. Sin embargo, el efecto de la variación de la metilación sobre dichos parámetros es relativamente modesto. Si son confirmados por otros estudios, estos resultados subrayan la complejidad del reto de identificar un pequeño número de blancos genómicos adecuados para la intervención epigenética. Sin duda, el progreso de la investigación en epigenética básica, en tecnologías de edición del epigenoma y en la descripción del epigenoma vascular revelará si la epigenética podrá tener un papel importante en la clínica cardiovascular.

## Responsabilidades éticas

**Protección de personas y animales.** Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

**Confidencialidad de los datos.** Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

**Derecho a la privacidad y consentimiento informado.** Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

### Financiación

Este trabajo se ha llevado a cabo gracias a un proyecto financiado por las Becas FEA/SEA 2011 "Manuel de Oya" para Investigación en nutrición; dos proyectos subvencionados por el Fondo de Investigación Sanitaria FIS (PI10/02547 y PI12/01766); y el CIBERDEM.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

### Bibliografía

1. Stylianou IM, Bauer RC, Reilly MP, Rader DJ. Genetic basis of atherosclerosis: Insights from mice and humans. *Circ Res.* 2012;110:337–55.
2. Ordovás JM, Smith CE. Epigenetics and cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol.* 2010;7:510–9.
3. Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature.* 1985;321:209–13.
4. Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* 2011;25:1010–22.
5. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell.* 1999;99:247–57.
6. Stroud H, Feng S, Morey Kinney S, Pradhan S, Jacobsen SE. 5-hydroxymethylcytosine is associated with enhancers and gene bodies in human embryonic stem cells. *Genome Biol.* 2011;12:R54.
7. Kriaucionis S, Heintz N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science.* 2009;324:929–30.
8. Globisch D, Münzel M, Müller M, Michalakakis S, Wagner M, Koch S, et al. Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates. *PLoS One.* 2010;5:e15367.
9. Dje N'Guessan P, Riediger F, Vardarova K, Scharf S, Eitel J, Opitz B, et al. Statins control oxidized LDL-mediated histone modifications and gene expression in cultured human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:380–6.
10. Mathew OP, Ranganna K, Yatsu FM. Butyrate and HDAC inhibitor, stimulates interplay between different posttranslational modifications of histone H3 and differently alters G1-specific cell cycle proteins in vascular smooth muscle cells. *Biomed Pharmacother.* 2010;64:733–40.
11. Hiltunen MO, Turunen MP, Häkkinen TP, Rutanen J, Hedman M, Mäkinen K, et al. DNA hypomethylation and methyltransferase expression in atherosclerotic lesions. *Vasc Med.* 2002;7:5–11.
12. Lund G, Andersson L, Lauria M, Lindholm M, Fraga MF, Villar-Garea A, et al. DNA methylation polymorphisms precede any histological sign of atherosclerosis in mice lacking apolipoprotein E. *J Biol Chem.* 2004;279:29147–54.
13. Zaina S, Heyn H, Carmona FJ, Varol N, Sayols S, Condom E, et al. DNA methylation map of human atherosclerosis. *Circ Cardiovasc Genet.* 2014;7:692–700.
14. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 2009;19:92–105.
15. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell.* 2005;120:15–20.
16. Check EH. Thousands of proteins affected by miRNAs. *Nature.* 2008;454:562.
17. Price NL, Ramírez CM, Fernández-Hernando C. Relevance of microRNA in metabolic diseases. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2014;51:305–20.
18. Leung A, Trac C, Jin W, Lanting L, Akbany A, Sætrom P, et al. Novel long noncoding RNAs are regulated by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 2013;113:266–78.
19. Schonrock N, Harvey RP, Mattick JS. Long noncoding RNAs in cardiac development and pathophysiology. *Circ Res.* 2012;111:1349–62.
20. Cao Y, Lu L, Liu M, Li X-C, Sun R-R, Zheng Y, et al. Impact of epigenetics in the management of cardiovascular disease: A review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014;18:3097–104.
21. Michalik KM, You X, Manavs.ki Y, Doddaballapur A, Zörnig M, Braun T, et al. Long noncoding RNA MALAT1 regulates endothelial cell function and vessel growth. *Circ Res.* 2014;114:1389–97.
22. Harismendy O, Notani D, Song X, Rahim NG, Tanasa B, Heintzman N, et al. 9p21 DNA variants associated with coronary artery disease impair interferon-(signalling response). *Nature.* 2011;470:264–8.
23. Wang K, Liu F, Zhou L-Y, Long B, Yuan S-M, Wang Y, et al. The long noncoding RNA CHRF regulates cardiac hypertrophy by targeting miR-489. *Circ Res.* 2014;114:1377–88.
24. Grote P, Wittler L, Hendrix D, Koch F, Währisch S, Beisaw A, et al. The tissue-specific lncRNA Fendrr is an essential regulator of heart and body wall development in the mouse. *Dev Cell.* 2013;24:206–14.
25. Ohtani K, Dimmeler S. Control of cardiovascular differentiation by microRNAs. *Basic Res Cardiol.* 2011;106:5–11.
26. Agirre X, Vilas-Zornoza A, Jiménez-Velasco A, Martín-Subero JI, Cordeu L, Gárate L, et al. Epigenetic silencing of the tumor suppressor microRNA Hsa-miR-124a regulates CDK6 expression and confers a poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.* 2009;69:4443–53.
27. Papait R, Greco C, Kunderfranco P, Latronico MVG, Condorelli G. Epigenetics: A new mechanism of regulation of heart failure? *Basic Res Cardiol.* 2013;108:361.
28. Guo X, Xia J, Yan J. Promoter methylated microRNAs: Potential therapeutic targets in gastric cancer. *Mol Med Rep.* 2015;11:759–65.
29. Chen J-F, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet.* 2006;38:228–33.
30. Lujambio A, Calin GA, Villanueva A, Ropero S, Sánchez-Céspedes M, Blanco D, et al. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:13556–61.
31. Lopez-Serra P, Esteller M. DNA methylation-associated silencing of tumor-suppressor microRNAs in cancer. *Oncogene.* 2012;31:1609–22.
32. Kozaki K, Imoto I, Mogi S, Omura K, Inazawa J. Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. *Cancer Res.* 2008;68:2094–105.
33. Liu R, Jacobs DI, Hansen J, Fu A, Stevens RG, Zhu Y. Aberrant methylation of miR-34b is associated with long-term shiftwork: A potential mechanism for increased breast cancer susceptibility. *Cancer Causes Control.* 2014.
34. Garzon R, Liu S, Fabbri M, Liu Z, Heaphy CEA, Callegari E, et al. MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and



- tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1. *Blood*. 2009;113:6411–8.
35. Raftopoulos L, Katsi V, Makris T, Tousoulis D, Stefanadis C, Kallikazaros I. Epigenetics, the missing link in hypertension. *Life Sci*. 2014.
  36. Enright AJ, John B, Gaul U, Tuschl T, Sander C, Marks DS. MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol*. 2003;5:R1.
  37. Stuwe E, Tóth KF, Aravin AA. Small but sturdy: Small RNAs in cellular memory and epigenetics. *Genes Dev*. 2014;28:423–31.
  38. Boon RA, Iekushi K, Lechner S, Seeger T, Fischer A, Heydt S, et al. MicroRNA-34a regulates cardiac ageing and function. *Nature*. 2013;495:107–10.
  39. Fuller AM, Qian L. Miriad roles for microRNAs in cardiac development and regeneration. *Cells*. 2014;3:724–50.
  40. Wahlquist C, Jeong D, Rojas-Muñoz A, Kho C, Lee A, Mitsuyama S, et al. Inhibition of miR-25 improves cardiac contractility in the failing heart. *Nature*. 2014;508:531–5.
  41. Hullinger TG, Montgomery RL, Seto AG, Dickinson BA, Semus HM, Lynch JM, et al. Inhibition of miR-15 protects against cardiac ischemic injury. *Circ Res*. 2012;110:71–81.
  42. Merk DR, Chin JT, Dake BA, Maegdefessel L, Miller MO, Kimura N, et al. miR-29b participates in early aneurysm development in Marfan syndrome. *Circ Res*. 2012;110:312–24.
  43. Abdellatif M. Differential expression of microRNAs in different disease states. *Circ Res*. 2012;110:638–50.
  44. Boettger T, Braun T. A new level of complexity: The role of microRNAs in cardiovascular development. *Circ Res*. 2012;110:1000–13.
  45. Corsten MF, Papageorgiou A, Verhesen W, Carai P, Lindow M, Obad S, et al. MicroRNA profiling identifies microRNA-155 as an adverse mediator of cardiac injury and dysfunction during acute viral myocarditis. *Circ Res*. 2012;111:415–25.
  46. Creemers EE, Tijssen AJ, Pinto YM. Circulating microRNAs: Novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circ Res*. 2012;110:483–95.
  47. Yates LA, Norbury CJ, Gilbert RJC. The long and short of microRNA. *Cell*. 2013;153:516–9.
  48. Huang Z-P, Chen J, Seok HY, Zhang Z, Kataoka M, Hu X, et al. MicroRNA-22 regulates cardiac hypertrophy and remodeling in response to stress. *Circ Res*. 2013;112:1234–43.
  49. Srivastava D, Heidersbach AJ. Small solutions to big problems: MicroRNAs for cardiac regeneration. *Circ Res*. 2013;112:1412–4.
  50. Volkmann I, Kumarswamy R, Pfaff N, Fiedler J, Dangwal S, Holzmann A, et al. MicroRNA-mediated epigenetic silencing of sirtuin 1 contributes to impaired angiogenic responses. *Circ Res*. 2013;113:997–1003.
  51. Nam Y-J, Song K, Luo X, Daniel E, Lambeth K, West K, et al. Reprogramming of human fibroblasts toward a cardiac fate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:5588–93.
  52. Eulatio A, Mano M, Dal Ferro M, Zentilin L, Sinagra G, Zaccagna S, et al. Functional screening identifies miRNAs inducing cardiac regeneration. *Nature*. 2012;492:376–81.
  53. Chen J, Huang Z-P, Seok HY, Ding J, Kataoka M, Zhang Z, et al. Mir-17-92 cluster is required for and sufficient to induce cardiomyocyte proliferation in postnatal and adult hearts. *Circ Res*. 2013;112:1557–66.
  54. Van Rooij E, Olson EN. MicroRNAs: Powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. *J Clin Invest*. 2007;117:2369–76.
  55. Aryal B, Rotllan N, Fernández-Hernando C. Noncoding RNAs and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2014;16:407.
  56. Rotllan N, Ramirez CM, Aryal B, Esau CC, Fernandez-Hernando C. Therapeutic silencing of microRNA-33 inhibits the progression of atherosclerosis in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice. Brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33:1973–7.
  57. Rayner KJ, Esau CC, Hussain FN, McDaniel AL, Marshall SM, van Gils JM, et al. Inhibition of miR-33a/b in non-human primates raises plasma HDL and lowers VLDL triglycerides. *Nature*. 2011;478:404–7.
  58. Rayner KJ, Sheedy FJ, Esau CC, Hussain FN, Temel RE, Parathath S, et al. Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2011;121:2921–31.
  59. Soh J, Iqbal J, Queiroz J, Fernandez-Hernando C, Hussain MM. MicroRNA-30c reduces hyperlipidemia and atherosclerosis in mice by decreasing lipid synthesis and lipoprotein secretion. *Nat Med*. 2013;19:892–900.
  60. Zernecke A, Bidzhekov K, Noels H, Shagdarsuren E, Gan L, Denecke B, et al. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal*. 2009;2:ra81.
  61. Suárez Y, Wang C, Manes TD, Pober JS. Cutting edge: TNF-induced microRNAs regulate TNF-induced expression of E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 on human endothelial cells: Feedback control of inflammation. *J Immunol*. 2010;184:21–5.
  62. Fang Y, Shi C, Manduchi E, Civelek M, Davies PF. MicroRNA-10a regulation of proinflammatory phenotype in atherosusceptible endothelium in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:13450–5.
  63. Sun X, Icli B, Wara AK, Belkin N, He S, Kobzik L, et al. MicroRNA-181b regulates NF- $\kappa$ B-mediated vascular inflammation. *J Clin Invest*. 2012;122:1973–90.
  64. Sun X, He S, Wara AK, Icli B, Shvartz E, Tesmenitsky Y, et al. Systemic delivery of microRNA-181b inhibits nuclear factor- $\kappa$ B activation, vascular inflammation, and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circ Res*. 2014;114:32–40.
  65. Wang M, Li W, Chang G-Q, Ye C-S, Ou J-S, Li X-X, et al. MicroRNA-21 regulates vascular smooth muscle cell function via targeting tropomyosin 1 in arteriosclerosis obliterans of lower extremities. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31:2044–53.
  66. Sarkar J, Gou D, Turaka P, Viktorova E, Ramchandran R, Raj JU. MicroRNA-21 plays a role in hypoxia-mediated pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and migration. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2010;299:L861–71.
  67. Boettger T, Beetz N, Kostin S, Schneider J, Krüger M, Hein L, et al. Acquisition of the contractile phenotype by murine arterial smooth muscle cells depends on the Mir143/145 gene cluster. *J Clin Invest*. 2009;119:2634–47.
  68. Cheng Y, Liu X, Yang J, Lin Y, Xu D-Z, Lu Q, et al. MicroRNA-145, a novel smooth muscle cell phenotypic marker and modulator, controls vascular neointimal lesion formation. *Circ Res*. 2009;105:158–66.
  69. Cordes KR, Sheehy NT, White MP, Berry EC, Morton SU, Muth AN, et al. miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature*. 2009;460:705–10.
  70. Xin M, Small EM, Sutherland LB, Qi X, McAnally J, Plato CF, et al. MicroRNAs miR-143 and miR-145 modulate cytoskeletal dynamics and responsiveness of smooth muscle cells to injury. *Genes Dev*. 2009;23:2166–78.
  71. Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol*. 2008;10:1470–6.
  72. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007;9:654–9.
  73. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol*. 2011;13:423–33.

74. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al. Argonaute 2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:5003–8.
75. Ikeda S, Kong SW, Lu J, Bisping E, Zhang H, Allen PD, et al. Altered microRNA expression in human heart disease. *Physiol Genomics*. 2007;31:367–73.
76. Chang S, McKinsey TA, Zhang CL, Richardson JA, Hill JA, Olson EN. Histone deacetylases 5 and 9 govern responsiveness of the heart to a subset of stress signals and play redundant roles in heart development. *Mol Cell Biol*. 2004;24:8467–76.
77. Latronico MVG, Condorelli G. MicroRNAs and cardiac pathology. *Nat Rev Cardiol*. 2009;6:419–29.
78. Wilson KD, Hu S, Venkatasubrahmanyam S, Fu J-D, Sun N, Abilez OJ, et al. Dynamic microRNA expression programs during cardiac differentiation of human embryonic stem cells: Role for miR-499. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010;3:426–35.
79. Sluijter JPG, van Mil A, van Vliet P, Metz CHG, Liu J, Doevendans PA, et al. MicroRNA-1 and -499 regulate differentiation and proliferation in human-derived cardiomyocyte progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30:859–68.
80. Jayawardena TM, Egemnazarov B, Finch EA, Zhang L, Payne JA, Pandya K, et al. MicroRNA-mediated in vitro and in vivo direct reprogramming of cardiac fibroblasts to cardiomyocytes. *Circ Res*. 2012;110:1465–73.
81. Meyer KD, Saletore Y, Zumbo P, Elemento O, Mason CE, Jaffrey SR. Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell*. 2012;149:1635–46.
82. Dunn GA, Bale TL. Maternal high-fat diet effects on third-generation female body size via the paternal lineage. *Endocrinology*. 2011;152:2228–36.
83. Ulrey CL, Liu L, Andrews LG, Tollefsbol TO. The impact of metabolism on DNA methylation. *Hum Mol Genet*. 2005;14. Spec No:R139-47.
84. Stampfer MJ, Malinow MR, Willett WC, Newcomer LM, Upson B, Ullmann D, et al. A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians. *JAMA*. 1992;268:877–81.
85. Woodward M, Rumley A, Rumley A, Rumley C, Lewington S, Morrison CE, et al. The association between homocysteine and myocardial infarction is independent of age, sex, blood pressure, cholesterol, smoking and markers of inflammation: The Glasgow myocardial infarction study. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2006;17:1–5.
86. Loscalzo J. The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest*. 1996;98:5–7.
87. Dayal S, Bottiglieri T, Arning E, Maeda N, Malinow MR, Sigmund CD, et al. Endothelial dysfunction and elevation of S-adenosylhomocysteine in cystathionine beta-synthase-deficient mice. *Circ Res*. 2001;88:1203–9.
88. Moens AL, Claeys MJ, Wuyts FL, Goovaerts I, van Hertbruggen E, Wendelen LC, et al. Effect of folic acid on endothelial function following acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 2007;99:476–81.
89. Wiernicki I, Millo B, Safranow K, Gorecka-Szyld B, Gutowski P. MMP-9, homocysteine and CRP circulating levels are associated with intraluminal thrombus thickness of abdominal aortic aneurysms: New implication of the old biomarkers. *Dis Markers*. 2011;31:67–74.
90. Jacob RA, Gretz DM, Taylor PC, James SJ, Pogribny IP, Miller BJ, et al. Moderate folate depletion increases plasma homocysteine and decreases lymphocyte DNA methylation in postmenopausal women. *J Nutr*. 1998;128:1204–12.
91. Rampersaud GC, Kauwell GP, Hutson AD, Cerda JJ, Bailey LB. Genomic DNA methylation decreases in response to moderate folate depletion in elderly women. *Am J Clin Nutr*. 2000;72:998–1003.
92. Castro R, Rivera I, Ravasco P, Camilo ME, Jakobs C, Blom HJ, et al. 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C->T and 1298A->C mutations are associated with DNA hypomethylation. *J Med Genet*. 2004;41:454–8.
93. Friso S, Choi S-W, Girelli D, Mason JB, Dolnikowski GG, Bagley PJ, et al. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:5606–11.
94. Liang Y, Yang X, Ma L, Cai X, Wang L, Yang C, et al. Homocysteine-mediated cholesterol efflux via ABCA1 and ACAT1 DNA methylation in THP-1 monocyte-derived foam cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2013;45:220–8.
95. Jiang Y, Jiang J, Xiong J, Cao J, Li N, Li G, et al. Homocysteine-induced extracellular superoxide dismutase and its epigenetic mechanisms in monocytes. *J Exp Biol*. 2008;211:911–20.
96. Swain JL, Stewart TA, Leder P. Parental legacy determines methylation and expression of an autosomal transgene: A molecular mechanism for parental imprinting. *Cell*. 1987;50:719–27.
97. Ogawa O, Eccles MR, Szeto J, McNoe LA, Yun K, Maw MA, et al. Relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting implicated in Wilms' tumour. *Nature*. 1993;362:749–51.
98. Waterland RA, Jirtle RL. Transposable elements: Targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Mol Cell Biol*. 2003;23:5293–300.
99. Kerkel K, Spadola A, Yuan E, Kosek J, Jiang L, Hod E, et al. Genomic surveys by methylation-sensitive SNP analysis identify sequence-dependent allele-specific DNA methylation. *Nat Genet*. 2008;40:904–8.
100. Zaina S, Pérez-Luque EL, Lund G. Genetics talks to epigenetics? The interplay between sequence variants and chromatin structure. *Curr Genomics*. 2010;11:359–67.
101. Dunn J, Qiu H, Kim S, Jjingo D, Hoffman R, Kim CW, et al. Flow-dependent epigenetic DNA methylation regulates endothelial gene expression and atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2014;124:3187–99.
102. Cao Q, Wang X, Jia L, Mondal AK, Diallo A, Hawkins GA, et al. Inhibiting DNA Methylation by 5-Aza-2'-deoxycytidine ameliorates atherosclerosis through suppressing macrophage inflammation. *Endocrinology*. 2014;155:4925–38.
103. Hidalgo B, Irvin MR, Sha J, Zhi D, Aslibekyan S, Absher D, et al. Epigenome-wide association study of fasting measures of glucose, insulin, and HOMA-IR in the Genetics of lipid lowering drugs and diet network study. *Diabetes*. 2014;63:801–7.
104. Dick KJ, Nelson CP, Tsaprouni L, Sandling JK, Aïssi D, Wahl S, et al. DNA methylation and body-mass index: A genome-wide analysis. *Lancet*. 2014;383:1990–8.
105. Irvin MR, Zhi D, Joehanes R, Mendelson M, Aslibekyan S, Claas Sa, et al. Epigenome-wide association study of fasting blood lipids in the genetics of lipid-lowering drugs and diet network study. *Circulation*. 2014;130:565–72.
106. Fish JE, Matouk CC, Rachlis A, Lin S, Tai SC, D'Abreo C, et al. The expression of endothelial nitric-oxide synthase is controlled by a cell-specific histone code. *J Biol Chem*. 2005;280:24824–38.
107. Chan GC, Fish JE, Mawji IA, Leung DD, Rachlis AC, Marsden PA. Epigenetic basis for the transcriptional hyporesponsiveness of the human inducible nitric oxide synthase gene in vascular endothelial cells. *J Immunol*. 2005;175:3846–61.
108. Kim J, Kim JY, Song KS, Lee YH, Seo JS, Jelinek J, et al. Epigenetic changes in estrogen receptor beta gene in atherosclerotic cardiovascular tissues and in-vitro vascular senescence. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1772:72–80.
109. Laukkanen MO, Mannermaa S, Hiltunen MO, Aittomäki S, Airenne K, Jänne J, et al. Local hypomethylation in atherosclerosis found in rabbit ec-sod gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:2171–8.

110. Schroeder M, Mass MJ. CpG methylation inactivates the transcriptional activity of the promoter of the human p53 tumor suppressor gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;235:403–6.
111. Sato N, Maehara N, Su GH, Goggins M. Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on matrix metalloproteinase expression and pancreatic cancer cell invasiveness. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95:327–30.
112. Wild A, Ramaswamy A, Langer P, Celik I, Fendrich V, Chaloupka B, et al. Frequent methylation-associated silencing of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene in pancreatic endocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:1367–73.
113. Couvert P, Carrié A, Tezenas du Montcel S, Vaysse J, Sutton A, Barget N, et al. Insulin-like growth factor 2 gene methylation in peripheral blood mononuclear cells of patients with hepatitis C related cirrhosis or hepatocellular carcinoma. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2012;36:345–51.
114. Lin XH, Guo C, Gu LJ, Deuel TF. Site-specific methylation inhibits transcriptional activity of platelet-derived growth factor A-chain promoter. *J Biol Chem.* 1993;268:17334–40.
115. Zampetaki A, Zeng L, Margariti A, Xiao Q, Li H, Zhang Z, et al. Histone deacetylase 3 is critical in endothelial survival and atherosclerosis development in response to disturbed flow. *Circulation.* 2010;121:132–42.
116. Wierda RJ, Geutskens SB, Jukema JW, Quax PHA, van den Elsen PJ. Epigenetics in atherosclerosis and inflammation. *J Cell Mol Med.* 2010;14:1225–40.
117. Larsson L, Thorbert-Mros S, Rymo L, Berglundh T. Influence of epigenetic modifications of the interleukin-10 promoter on IL10 gene expression. *Eur J Oral Sci.* 2012;120:14–20.
118. Wang J, Jiang Y, Yang A, Sun W, Ma C, Ma S, et al. Hyperhomocysteinemia-induced monocyte chemoattractant protein-1 promoter DNA Methylation by nuclear factor- $\kappa$ B/DNA Methyltransferase 1 in apolipoprotein E-deficient mice. *Biores Open Access.* 2013;2:118–27.
119. Choi J-H, Nam K-H, Kim J, Baek MW, Park J-E, Park H-Y, et al. Trichostatin A exacerbates atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:2404–9.
120. Tanaka Y, Fukudome K, Hayashi M, Takagi S, Yoshie O. Induction of ICAM-1 and LFA-3 by Tax1 of human T-cell leukemia virus type 1 and mechanism of down-regulation of ICAM-1 or LFA-1 in adult-T-cell-leukemia cell lines. *Int J Cancer.* 1995;60:554–61.
121. Devlin AM, Singh R, Wade RE, Innis SM, Bottiglieri T, Lentz SR. Hypermethylation of Fads2 and altered hepatic fatty acid and phospholipid metabolism in mice with hyperhomocysteinemia. *J Biol Chem.* 2007;282:37082–90.
122. Guardiola M, Oliva I, Guillaumet A, Martin-Trujillo A, Rosales R, Vallvé JC, et al. Tissue-specific DNA methylation profiles regulate liver-specific expression of the APOA1/C3/A4/A5 cluster and can be manipulated with demethylating agents on intestinal cells. *Atherosclerosis.* 2014;237:528–35.
123. Guay SP, Brisson D, Lamarche B, Marceau P, Vohl MC, Gaudet D, et al. DNA methylation variations at CETP and LPL gene promoter loci: New molecular biomarkers associated with blood lipid profile variability. *Atherosclerosis.* 2013;228:413–20.
124. Guay S-P, Légaré C, Houde A-A, Mathieu P, Bossé Y, Bouchard L. Acetylsalicylic acid, aging and coronary artery disease are associated with ABCA1 DNA methylation in men. *Clin Epigenetics.* 2014;6:14.
125. Houde A-A, Guay S-P, Desgagné V, Hivert M-F, Baillargeon J-P, St-Pierre J, et al. Adaptations of placental and cord blood ABCA1 DNA methylation profile to maternal metabolic status. *Epigenetics.* 2013;8:1289–302.
126. Guay S-P, Brisson D, Munger J, Lamarche B, Gaudet D, Bouchard L. ABCA1 gene promoter DNA methylation is associated with HDL particle profile and coronary artery disease in familial hypercholesterolemia. *Epigenetics.* 2012;7:464–72.
127. Jiang D, Zheng D, Wang L, Huang Y, Liu H, Xu L, et al. Elevated PLA2G7 gene promoter methylation as a gender-specific marker of aging increases the risk of coronary heart disease in females. *PLoS One.* 2013;8:e59752.
128. Marquart TJ, Allen RM, Ory DS, Baldán A. miR-33 links SREBP-2 induction to repression of sterol transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:12228–32.
129. Rayner KJ, Suárez Y, Dávalos A, Parathath S, Fitzgerald ML, Tamehiro N, et al. miR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science.* 2010;328:1570–3.
130. Ramírez CM, Rotllan N, Vlassov AV, Dávalos A, Li M, Goedeke L, et al. Control of cholesterol metabolism and plasma high-density lipoprotein levels by microRNA-144. *Circ Res.* 2013;112:1592–601.
131. Ramirez CM, Dávalos A, Goedeke L, Salerno AG, Warriar N, Cirera-Salinas D, et al. MicroRNA-758 regulates cholesterol efflux through posttranscriptional repression of ATP-binding cassette transporter A1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:2707–14.
132. Kim J, Yoon H, Ramírez CM, Lee S-M, Hoe H-S, Fernández-Hernando C, et al. miR-106b impairs cholesterol efflux and increases A $\beta$  levels by repressing ABCA1 expression. *Exp Neurol.* 2012;235:476–83.
133. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet.* 2011;12:861–74.
134. Nazari-Jahantigh M, Wei Y, Noels H, Akhtar S, Zhou Z, Koenen RR, et al. MicroRNA-155 promotes atherosclerosis by repressing Bcl6 in macrophages. *J Clin Invest.* 2012;122:4190–202.
135. Huang R, Hu G, Lin B, Lin Z, Sun C. MicroRNA-155 silencing enhances inflammatory response and lipid uptake in oxidized low-density lipoprotein-stimulated human THP-1 macrophages. *J Investig Med.* 2010;58:961–7.
136. Donners MMPC, Wolfs IMJ, Stöger LJ, van der Vorst EPC, Pöttgens CCH, Heymans S, et al. Hematopoietic miR155 deficiency enhances atherosclerosis and decreases plaque stability in hyperlipidemic mice. *PLoS One.* 2012;7:e35877.
137. Chen T, Huang Z, Wang L, Wang Y, Wu F, Meng S, et al. MicroRNA-125a-5p partly regulates the inflammatory response, lipid uptake, and ORP9 expression in oxLDL-stimulated monocyte/macrophages. *Cardiovasc Res.* 2009;83:131–9.
138. Yang K, He YS, Wang XQ, Lu L, Chen QJ, Liu J, et al. miR-146a inhibits oxidized low-density lipoprotein-induced lipid accumulation and inflammatory response via targeting toll-like receptor 4. *FEBS Lett.* 2011;585:854–60.
139. Liu G, Friggeri A, Yang Y, Park Y-J, Tsuruta Y, Abraham E. miR-147, a microRNA that is induced upon Toll-like receptor stimulation, regulates murine macrophage inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:15819–24.
140. Thulin P, Wei T, Werngren O, Cheung L, Fisher RM, Grandér D, et al. MicroRNA-9 regulates the expression of peroxisome proliferator-activated receptor (in human monocytes during the inflammatory response. *Int J Mol Med.* 2013;31:1003–10.
141. Davis BN, Hilyard AC, Lagna G, Hata A. SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature.* 2008;454:56–61.
142. Xie C, Huang H, Sun X, Guo Y, Hamblin M, Ritchie RP, et al. MicroRNA-1 regulates smooth muscle cell differentiation by repressing Kruppel-like factor 4. *Stem Cells Dev.* 2011;20:205–10.
143. Chen J, Yin H, Jiang Y, Radhakrishnan SK, Huang Z-P, Li J, et al. Induction of microRNA-1 by myocardin in smooth muscle cells inhibits cell proliferation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:368–75.
144. Torella D, Iaconetti C, Catalucci D, Ellison GM, Leone A, Waring CD, et al. MicroRNA-133 controls vascular smooth muscle cell



- phenotypic switch in vitro and vascular remodeling in vivo. *Circ Res.* 2011;109:880–93.
145. Davis BN, Hilyard AC, Nguyen PH, Lagna G, Hata A. Induction of microRNA-221 by platelet-derived growth factor signaling is critical for modulation of vascular smooth muscle phenotype. *J Biol Chem.* 2009;284:3728–38.
146. Liu X, Cheng Y, Zhang S, Lin Y, Yang J, Zhang C. A necessary role of miR-221 and miR-222 in vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia. *Circ Res.* 2009;104:476–87.
147. Latronico MVG, Catalucci D, Condorelli G. Emerging role of microRNAs in cardiovascular biology. *Circ Res.* 2007;101:1225–36.
148. Zhang P, Huang A, Ferruzzi J, Mecham RP, Starcher BC, Tellides G, et al. Inhibition of microRNA-29 enhances elastin levels in cells haploinsufficient for elastin and in bioengineered vessels—brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32:756–9.
149. Zhang Y, Wang Y, Wang X, Zhang Y, Eisner GM, Asico LD, et al. Insulin promotes vascular smooth muscle cell proliferation via microRNA-208-mediated downregulation of p21. *J Hypertens.* 2011;29:1560–8.
150. Yu M-L, Wang J-F, Wang G-K, You X-H, Zhao X-X, Jing Q, et al. Vascular smooth muscle cell proliferation is influenced by let-7d microRNA and its interaction with KRAS. *Circ J.* 2011;75:703–9.
151. Zhang Y, Chen N, Zhang J, Tong Y. Hsa-let-7g miRNA targets caspase-3 and inhibits the apoptosis induced by ox-LDL in endothelial cells. *Int J Mol Sci.* 2013;14:22708–20.
152. Chen K-C, Hsieh I-C, Hsi E, Wang Y-S, Dai C-Y, Chou W-W, et al. Negative feedback regulation between microRNA let-7g and the oxLDL receptor LOX-1. *J Cell Sci.* 2011;124:4115–24.
153. Choe N, Kwon J-S, Kim J-R, Eom GH, Kim Y, Nam K-I, et al. The microRNA miR-132 targets Lrrfp1 to block vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia. *Atherosclerosis.* 2013;229:348–55.
154. Liao X-B, Zhang Z-Y, Yuan K, Liu Y, Feng X, Cui R-R, et al. miR-133a modulates osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells. *Endocrinology.* 2013;154:3344–52.
155. Remus EW, Lyle AN, Weiss D, Landàzuri N, Weber M, Searles C, et al. miR181a protects against angiotensin II-induced osteopontin expression in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis.* 2013;228:168–74.
156. Harris TA, Yamakuchi M, Ferlito M, Mendell JT, Lowenstein CJ. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:1516–21.
157. Loyer X, Potteaux S, Vion A-C, Guérin CL, Boulkroun S, Rautou P-E, et al. Inhibition of microRNA-92a prevents endothelial dysfunction and atherosclerosis in mice. *Circ Res.* 2014;114:434–43.
158. Fang Y, Davies PF. Site-specific microRNA-92a regulation of Kruppel-like factors 4 and 2 in atherosusceptible endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32:979–87.
159. Poliseno L, Tuccoli A, Mariani L, Evangelista M, Citti L, Woods K, et al. MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood.* 2006;108:3068–71.
160. Suárez Y, Fernández-Hernando C, Pober JS, Sessa WC. Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells. *Circ Res.* 2007;100:1164–73.
161. Son DJ, Kumar S, Takabe W, Kim CW, Ni C-W, Alberts-Grill N, et al. The atypical mechanosensitive microRNA-712 derived from pre-ribosomal RNA induces endothelial inflammation and atherosclerosis. *Nat Commun.* 2013;4:3000.
162. Kuehbach A, Urbich C, Dimmeler S. Targeting microRNA expression to regulate angiogenesis. *Trends Pharmacol Sci.* 2008;29:12–5.
163. Urbich C, Kaluza D, Frömel T, Knau A, Bennewitz K, Boon RA, et al. MicroRNA-27a/b controls endothelial cell repulsion and angiogenesis by targeting semaphorin 6A. *Blood.* 2012;119:1607–16.
164. Ito T, Yagi S, Yamakuchi M. MicroRNA-34a regulation of endothelial senescence. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;398:735–40.
165. Menghini R, Casagrande V, Cardellini M, Martelli E, Terrinoni A, Amati F, et al. MicroRNA 217 modulates endothelial cell senescence via silent information regulator 1. *Circulation.* 2009;120:1524–32.
166. Cheng HS, Sivachandran N, Lau A, Boudreau E, Zhao JL, Baltimore D, et al. MicroRNA-146 represses endothelial activation by inhibiting pro-inflammatory pathways. *EMBO Mol Med.* 2013;5:949–66.
167. Liao Y-C, Wang Y-S, Guo Y-C, Lin W-L, Chang M-H, Juo S-HH. Let-7g improves multiple endothelial functions through targeting transforming growth factor-beta and SIRT-1 signaling. *J Am Coll Cardiol.* 2014;63:1685–94.
168. Heneghan HM, Miller N, McAnena OJ, O'Brien T, Kerin MJ. Differential miRNA expression in omental adipose tissue and in the circulation of obese patients identifies novel metabolic biomarkers. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96:E846–50.
169. Murri M, Insenser M, Fernández-Durán E, San-Millán JL, Escobar-Morreale HF. Effects of polycystic ovary syndrome (PCOS), sex hormones, and obesity on circulating miRNA-21, miRNA-27b, miRNA-103, and miRNA-155 expression. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98:E1835–44.
170. Pescador N, Pérez-Barba M, Ibarra JM, Corbatón A, Martínez-Larrad MT, Serrano-Ríos M. Serum circulating microRNA profiling for identification of potential type 2 diabetes and obesity biomarkers. *PLoS One.* 2013;8:e77251.
171. Wang Y, Li Y, Wang X, Zhang D, Zhang H, Wu Q, et al. Circulating miR-130b mediates metabolic crosstalk between fat and muscle in overweight/obesity. *Diabetologia.* 2013;56:2275–85.
172. Ortega FJ, Mercader JM, Catalán V, Moreno-Navarrete JM, Pueyo N, Sabater M, et al. Targeting the circulating microRNA signature of obesity. *Clin Chem.* 2013;59:781–92.
173. Prats-Puig A, Ortega FJ, Mercader JM, Moreno-Navarrete JM, Moreno M, Bonet N, et al. Changes in circulating microRNAs are associated with childhood obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98:E1655–60.
174. Caporali A, Emanuelli C. MicroRNA-503 and the extended microRNA-16 family in angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med.* 2011;21:162–6.
175. Balasubramanyam M, Aravind S, Gokulakrishnan K, Prabu P, Sathishkumar C, Ranjani H, et al. Impaired miR-146a expression links subclinical inflammation and insulin resistance in type 2 diabetes. *Mol Cell Biochem.* 2011;351:197–205.
176. Karolina DS, Armugam A, Tavintharan S, Wong MTK, Lim SC, Sum CF, et al. MicroRNA 144 impairs insulin signaling by inhibiting the expression of insulin receptor substrate 1 in type 2 diabetes mellitus. *PLoS One.* 2011;6:e22839.
177. Kong L, Zhu J, Han W, Jiang X, Xu M, Zhao Y, et al. Significance of serum microRNAs in pre-diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes: A clinical study. *Acta Diabetol.* 2011;48:61–9.
178. Zampetaki A, Willeit P, Drozdov I, Kiechl S, Mayr M. Profiling of circulating microRNAs: From single biomarkers to re-wired networks. *Cardiovasc Res.* 2012;93:555–62.
179. Rong Y, Bao W, Shan Z, Liu J, Yu X, Xia S, et al. Increased microRNA-146a levels in plasma of patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *PLoS One.* 2013;8:e73272.
180. Li T, Cao H, Zhuang J, Wan J, Guan M, Yu B, et al. Identification of miR-130a, miR-27b and miR-210 as serum biomarkers for atherosclerosis obliterans. *Clin Chim Acta.* 2011;412:66–70.
181. Gidlöf O, Andersson P, van der Pals J, Göteborg M, Erlinge D. Cardiospecific microRNA plasma levels correlate with troponin and cardiac function in patients with ST elevation myocardial infarction, are selectively dependent on renal

- elimination, and can be detected in urine samples. *Cardiology*. 2011;118:217–26.
182. D'Alessandra Y, Devanna P, Limana F, Straino S, Di Carlo A, Brambilla PG, et al. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2010;31:2765–73.
183. Olivieri F, Antonicelli R, Lorenzi M, D'Alessandra Y, Lazzarini R, Santini G, et al. Diagnostic potential of circulating miR-499-5p in elderly patients with acute non ST-elevation myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2013;167:531–6.
184. Meder B, Keller A, Vogel B, Haas J, Sedaghat-Hamedani F, Kayvanpour E, et al. MicroRNA signatures in total peripheral blood as novel biomarkers for acute myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*. 2011;106:13–23.
185. Wang R, Li N, Zhang Y, Ran Y, Pu J. Circulating microRNAs are promising novel biomarkers of acute myocardial infarction. *Intern Med*. 2011;50:1789–95.
186. Long G, Wang F, Duan Q, Chen F, Yang S, Gong W, et al. Human circulating microRNA-1 and microRNA-126 as potential novel indicators for acute myocardial infarction. *Int J Biol Sci*. 2012;8:811–8.
187. Devaux Y, Vausort M, McCann GP, Zangrando J, Kelly D, Razvi N, et al. MicroRNA-150: A novel marker of left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Circ Cardiovasc Genet*. 2013;6:290–8.
188. Matsumoto S, Sakata Y, Nakatani D, Suna S, Mizuno H, Shimizu M, et al. A subset of circulating microRNAs are predictive for cardiac death after discharge for acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;427:280–4.
189. Fichtlscherer S, de Rosa S, Fox H, Schwietz T, Fischer A, Liebertrau C, et al. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ Res*. 2010;107:677–84.
190. De Rosa S, Fichtlscherer S, Lehmann R, Assmus B, Dimmeler S, Zeiher AM. Transcoronary concentration gradients of circulating microRNAs. *Circulation*. 2011;124:1936–44.
191. Minami Y, Satoh M, Maesawa C, Takahashi Y, Tabuchi T, Itoh T, et al. Effect of atorvastatin on microRNA 221/222 expression in endothelial progenitor cells obtained from patients with coronary artery disease. *Eur J Clin Invest*. 2009;39:359–67.
192. Takahashi Y, Satoh M, Minami Y, Tabuchi T, Itoh T, Nakamura M. Expression of miR-146a/b is associated with the Toll-like receptor 4 signal in coronary artery disease: Effect of renin-angiotensin system blockade and statins on miRNA-146a/b and Toll-like receptor 4 levels. *Clin Sci (Lond)*. 2010;119:395–405.
193. Hoekstra M, van der Lans CAC, Halvorsen B, Gullestad L, Kuiper J, Aukrust P, et al. The peripheral blood mononuclear cell microRNA signature of coronary artery disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;394:792–7.
194. D'Alessandra Y, Carena MC, Spazzafumo L, Martinelli F, Bassetti B, Devanna P, et al. Diagnostic potential of plasmatic MicroRNA signatures in stable and unstable angina. *PLoS One*. 2013;8:e80345.
195. Sondermeijer BM, Bakker A, Halliani A, de Ronde MWJ, Marquart AA, Tijssen AJ, et al. Platelets in patients with premature coronary artery disease exhibit upregulation of miRNA340\* and miRNA624\*. *PLoS One*. 2011;6:e25946.
196. Fukushima Y, Nakanishi M, Nonogi H, Goto Y, Iwai N. Assessment of plasma miRNAs in congestive heart failure. *Circ J*. 2011;75:336–40.
197. Tijssen AJ, Creemers EE, Moerland PD, de Windt LJ, van der Wal AC, Kok WE, et al. miR423-5p as a circulating biomarker for heart failure. *Circ Res*. 2010;106:1035–9.
198. Goren Y, Kushnir M, Zafirir B, Tabak S, Lewis BS, Amir O. Serum levels of microRNAs in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2012;14:147–54.
199. Ellis KL, Cameron VA, Troughton RW, Frampton CM, Ellmers LJ, Richards AM. Circulating microRNAs as candidate markers to distinguish heart failure in breathless patients. *Eur J Heart Fail*. 2013;15:1138–47.
200. Corsten MF, Dennert R, Jochems S, Kuznetsova T, Devaux Y, Hofstra L, et al. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010;3:499–506.
201. Endo K, Naito Y, Ji X, Nakanishi M, Noguchi T, Goto Y, et al. MicroRNA 210 as a biomarker for congestive heart failure. *Biol Pharm Bull*. 2013;36:48–54.
202. Qiang L, Hong L, Ningfu W, Huaihong C, Jing W. Expression of miR-126 and miR-508-5p in endothelial progenitor cells is associated with the prognosis of chronic heart failure patients. *Int J Cardiol*. 2013;168:2082–8.
203. Zhao D-S, Chen Y, Jiang H, Lu J-P, Zhang G, Geng J, et al. Serum miR-210 and miR-30a expressions tend to revert to fetal levels in Chinese adult patients with chronic heart failure. *Cardiovasc Pathol*. 2013;22:444–50.
204. Villar AV, García R, Merino D, Llano M, Cobo M, Montalvo C, et al. Myocardial and circulating levels of microRNA-21 reflect left ventricular fibrosis in aortic stenosis patients. *Int J Cardiol*. 2013;167:2875–81.
205. García R, Villar AV, Cobo M, Llano M, Martín-Durán R, Hurlé MA, et al. Circulating levels of miR-133a predict the regression potential of left ventricular hypertrophy after valve replacement surgery in patients with aortic stenosis. *J Am Heart Assoc*. 2013;2:e000211.